

# Isolierung von total RNA aus einer humanen Zelllinie (HEK 293) mit TRIzol® in Eppendorf Tubes® 5.0 mL

Frauke Gotzhein<sup>1</sup>, Natascha Weiss<sup>2</sup>, Alice Tunkl<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universität Hamburg, Studiengang Molecular Life Sciences, Deutschland

<sup>2</sup> Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

<sup>3</sup> Eppendorf Instrumente GmbH, Hamburg, Deutschland

## Zusammenfassung

Da die RNA Isolierung mit TRIzol frei skalierbar ist, können sich bei entsprechender Menge an Ausgangsmaterial die Probenvolumina auch im Bereich zwischen 2 mL bis 5 mL bewegen. Solche Präparationen können dann nicht mehr in klassischen Mikrozentrifugengefäßen bis 2 mL durchgeführt werden. In dieser Application Note wird

gezeigt, dass diese Volumina sehr einfach und mit guter Ausbeute in den Eppendorf Tubes® 5.0 mL verarbeitet werden können. Ein besonderer Vorteil der Tubes im Vergleich zu konischen 15 mL Gefäßen stellt deren Design dar, was die benutzerfreundliche Handhabung in Verbindung mit kontaminationsfreiem Pipettieren ermöglicht.

## Einleitung

Die Aufreinigung von Nukleinsäuren ist die Grundlage eines breiten Spektrums weiterführender molekularbiologischer Anwendungen. Die dafür notwendigen Mengen an DNA oder RNA müssen durch den Einsatz von genügend Ausgangsmaterial für die Isolierung erzielt werden. Vorteilhaft sind auf der „single-step“ Methode [1] basierende Verfahren, aus der sich auch Reagenzien wie TRIzol entwickelt haben, da sie praktisch an jede beliebige Menge Ausgangsmaterial angepasst werden können und so sehr flexibel sind. Eine Einschränkung erfolgt jedoch über die zur Verfügung stehenden Gefäßformate. In dieser Application Note werden zur Isolierung von RNA mit TRIzol 4 mL als Ausgangsmaterial eingesetzt, nach Zugabe weiterer benötigter Reagenzien erhöht sich der Versuchsansatz auf 4,8 mL. In etablierten Basisprotokollen werden ebenfalls Probenvolumina erreicht, die ein Volumen von 2 mL übersteigen, so dass nicht mehr im handlichen 1,5/2,0 mL Gefäßformat gearbeitet werden kann [2, 3]. In solchen Fällen werden häufig konische 15 mL Gefäße verwendet. Diese haben, bei einem Durchmesser von 1,7 cm, eine Länge von etwa 12 cm und sind mit einem Schraubdeckel ausgestattet.

Die Länge der Gefäße bedingt, dass beim Pipettieren der Pipettenkonus in das Gefäß eingeführt werden muss, um bis auf den Boden zu gelangen. Dabei kommt es leicht zu einer

Berührung der Innenseite der Gefäße, was ein hohes Kontaminationsrisiko birgt. Die konischen Gefäße können in Abhängigkeit vom Hersteller und dem Typ bei ca. 6.000 - 15.000 x g zentrifugiert werden, während die Zentrifugationsbeständigkeit von Mikrozentrifugengefäßen, die üblicherweise im Bereich 20.000 – 30.000 x g liegt, weitaus höher ist. Bei Protokollen, in denen relativ hohe g-Zahlen vorgesehen sind, kann es dementsprechend notwendig sein, die Zentrifugationsschritte zu verlängern, um ein ausreichend gutes Ergebnis zu erzielen.

Mit dem Eppendorf Tube 5.0 mL können diese Nachteile vermieden werden. Es stellt eine handliche Alternative dar, die im Volumenbereich zwischen den gebräuchlichen 2 mL und 15 mL Gefäßen liegt. Die maximale Zentrifugationsgeschwindigkeit beträgt 25.000 x g, was bei Anwendungen wie der Präzipitation von Nukleinsäuren vorteilhaft sein kann. Im Vergleich zur Zentrifugation bei geringeren g-Zahlen kann entweder die Zentrifugationsdauer verkürzt werden oder es erhöht sich die Ausbeute (Wiedergewinnungsrate) [4].

Das folgende Experiment beschreibt die Isolierung von RNA mit TRIzol. Dabei wird das Eppendorf Tube 5.0 mL mit einem laborüblichen konischen 15 mL Gefäß bezüglich der Ausbeute an RNA und der Handhabung verglichen.

## Material und Methoden

### RNA Isolierung

Die RNA Isolierung wurde jeweils in einer Doppelbestimmung in Eppendorf Tubes 5.0 mL und konischen 15 mL Gefäßen gemäß dem Herstellerprotokoll des TRIzol [5] durchgeführt. Dafür wurde die adhärenzte Zelllinie HEK 293 in Zellkulturflaschen ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Zur Lyse wurden pro 10 mm<sup>2</sup> Kulturoberfläche jeweils 1 mL TRIzol zugegeben. Die Ansätze mehrerer Flaschen wurden gepoolt, um für alle Gefäßtypen die gleichen Bedingungen zu schaffen. Nach dem Überführen von je 4 mL des Ausgangsmaterials in jedes Gefäß wurden entsprechend dem TRIzol Protokoll jeweils 800 µL Chloroform verwendet. Für die Präzipitation der RNA aus der wässrigen Phase wurden dann 2 mL Isopropanol und beim anschließenden Waschschrift 4 mL Ethanol (75 %) eingesetzt. Abweichend vom Protokoll wurden bei der Präzipitation und dem Waschschrift der RNA die 5,0 mL Gefäße bei 20.913 x g zentrifugiert. Das am Ende vorliegende RNA Pellet wurde in 50 µL DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen.

## Ergebnisse und Diskussion

In Tabelle 1 sind die Mittelwerte der photometrischen Messungen der RNA Proben aufgeführt. Insgesamt wurden 10,8 µg/µL RNA für das Eppendorf Gefäß und 9,0 µg/µL für das konische 15 mL Gefäß erzielt. Berechnet auf das Elutionsvolumen von 50 µL, ergeben sich daraus Gesamtausbeuten von 540 µg bzw. 450 µg RNA.

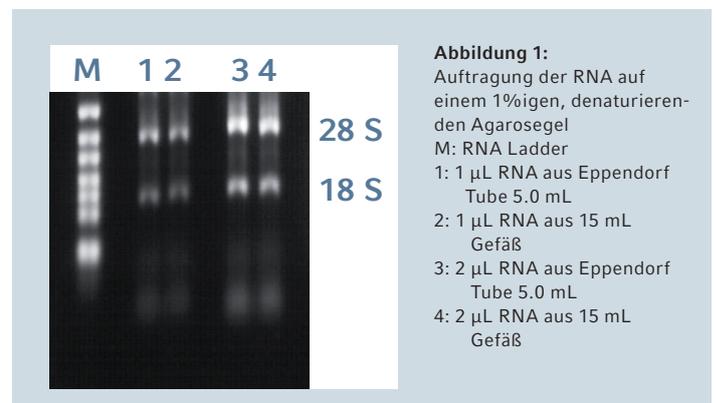
Auf dem denaturierenden, 1 %igen Agarosegel (Abb. 1) wurden jeweils 1 µL bzw. 2 µL der erhaltenen RNA aufgetragen. In allen Spuren sind die zwei Banden der 28 S und 18 S Untereinheiten der ribosomalen RNA sichtbar.

### Analyse der RNA

Die Ausbeute der isolierten RNA wurde mit dem Eppendorf BioPhotometer® plus in Eppendorf UVetten bestimmt und daraus die Mittelwerte gebildet. Des Weiteren wurden die RNA Proben des gleichen Gefäßtyps gepoolt und in einer 1:4 Verdünnung auf einem 1 %igen, denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, um die Qualität und Größen der einzelnen RNA Untereinheiten zu überprüfen.

**Tabelle 1:** Konzentration der isolierten RNA Proben

Gefäßtyp	RNA Konzentration [µg/µL]
Eppendorf Tube 5.0 mL	10,8
Konisches 15 mL Gefäß	9,0



Die etwas höhere Ausbeute, die mit dem 5 mL Gefäß im Vergleich zum 15 mL Gefäß erzielt wurde, könnte auf die höhere Zentrifugationsgeschwindigkeit zurückzuführen sein, die bei der Präzipitation und dem Waschschrift eingesetzt werden konnte.

In der Handhabung zeigte das Eppendorf Tube 5.0 mL erhebliche Vorteile. Im Unterschied zu dem konischen 15 mL Tube war es mit dem Eppendorf Gefäß möglich, sämtliche Pipettierschritte durchzuführen, ohne dabei den Pipetten-

konus in das Gefäß einzuführen. So bestand keine Gefahr, Probenmaterial durch die Pipette zu verschleppen. Weiterhin war das Öffnen und Schließen des Schnappdeckels wesentlich angenehmer als der umständliche Gebrauch des Schraubdeckels des 15 mL Gefäßes. Die Deckelform des 5 mL Tubes war bei der definierten Ausrichtung in der Zentrifuge hilfreich, so dass schwer sichtbare Pellets bei folgenden Pipettierschritten einfacher zu lokalisieren waren.

## Fazit

Das Eppendorf Tube 5.0 mL konnte erfolgreich für die Isolierung von RNA eingesetzt werden. Im Vergleich zu konischen 15 mL Gefäßen wurde eine mindestens vergleichbare Ausbeute erzielt. Es zeigten sich zusätzlich deutliche

Vorteile in der Handhabung, da sich alle Schritte bequem und unter Vermeidung von Kontaminationen in dem 5.0 mL Tube durchführen ließen.

## Literatur

- [1] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-159.
- [2] Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- [3] Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Smith JA, Seidman J, and Struhl K. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Publishing Associates; 1996.
- [4] Eppendorf Application Note 234: Bessere Wiedergewinnungsraten und verkürzte Zentrifugationszeiten durch Zentrifugation bei 30.000 x g (<http://www.eppendorf.de>).
- [5] Anleitung TRIzol® Reagent ([www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)).

**Bestellinformationen**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Best.-Nr.</b>
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Eppendorf Quality, 200 Gefäße	0030 119.401
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, PCR clean, 200 Gefäße	0030 119.460
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Sterile, 200 Gefäße	0030 119.487
Eppendorf Tubes® 5.0 mL, Biopur®, 50 Gefäße (einzeln verpackt)	0030 119.479
Eppendorf Protein LoBind Tubes 5.0 mL, PCR clean, 100 Gefäße	0030 108.302
Eppendorf DNA LoBind Tubes 5.0 mL, PCR clean, 200 Gefäße	0030 108.310
Tube Clip 5.0 mL, 10 Stück, zur Fixierung des Deckels	0030 119.509
Starter Pack Eppendorf Tubes® 5.0 mL, PCR clean, 400 Gefäße, 2 Racks (je 16 Plätze), weiß, 8 Stück Universaladapter für Rotore mit Bohrung für 15 mL konische Gefäße	0030 119.380
Eppendorf BioPhotometer® plus, 230 V/50-60 Hz	6132 000.008
UVette®, Original Eppendorf UV-transparente Kunststoffküvette, einzeln verpackt, PCR clean, zertifiziert, 80 Stück	0030 106.300
UVette® routine pack, Eppendorf Quality Reinheitsgrad, wiederverschließbare Box, 200 Stück	0030 106.318

**Your local distributor: [www.eppendorf.com/contact](http://www.eppendorf.com/contact)**

Eppendorf AG · 22331 Hamburg · Germany  
 eppendorf@eppendorf.com · [www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

[www.eppendorf.com](http://www.eppendorf.com)

TRizol® ist eine eingetragene Marke von Molecular Research Center, Inc.  
 Eppendorf® und das Eppendorf logo, Eppendorf Biopur®, Eppendorf BioPhotometer®, UVette® und Eppendorf Tubes® sind registrierte Marken der Eppendorf AG, Deutschland.  
 Alle Rechte vorbehalten, einschließlich Grafiken und Bilder. Copyright © 2013 by Eppendorf AG.